


EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND USE**Publication number:** JP2000500757T**Publication date:** 2000-01-25**Inventor:****Applicant:****Classification:**

- international: *C07D277/24; A01N43/22; A01N43/78; A01N43/90; A61K31/00; A61K31/335; A61K31/425; A61K31/426; A61K31/427; A61P35/00; A61P37/00; A61P37/06; C07D277/30; C07D313/00; C07D417/06; C07D493/04; C07D493/08; C07D493/18; C07D497/08; C07F7/18; A01N43/02; A01N43/72; A01N43/90; A61K31/00; A61K31/335; A61K31/425; A61K31/426; A61K31/427; A61P35/00; A61P37/00; C07D277/00; C07D313/00; C07D417/00; C07D493/00; C07D497/00; C07F7/00; (IPC1-7): C07D277/24; A61K31/335; A61K31/426; A61K31/427; A61P35/00; A61P37/06; C07D313/00; C07D417/06; C07D493/04; C07D493/08; C07D497/08; C07F7/18*

- European: A01N43/22; A01N43/78; A01N43/90; C07D277/30; C07D417/06; C07D493/04; C07D493/08; C07D493/18; C07F7/18C4D4D

Application number: JP19960519381T 19961118**Priority number(s):** DE19951042986 19951117; DE19961039456 19960925; WO1996EP05080 19961118**Also published as:**

 WO9719086 (A1)
 EP0873341 (A1)
 US6288237 (B1)
 EP0873341 (A0)
 EP0873341 (B1)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2000500757T

Abstract of corresponding document: **WO9719086**

The invention relates to epothilone derivatives and the use thereof.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-500757

(P2000-500757A)

(43) 公表日 平成12年1月25日 (2000.1.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 D 277/24		C 0 7 D 277/24	
A 6 1 P 35/00		A 6 1 K 31/00	6 3 5
37/06			6 3 7 D
A 6 1 K 31/335		31/335	
31/426		31/425	6 0 1
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-519381	(71) 出願人	ゲゼルシャフト・フュア・ビオテヒノロジ ッシェ・フォルシュング・ミット・ベシュ レンクテル・ハフツング (ゲー・ベー・エ フ)
(86) (22) 出願日	平成8年11月18日 (1996. 11. 18)		ドイツ連邦共和国 D-38124 ブラウン シュバイグ マッシエルオーデル ベッグ 1
(85) 翻訳文提出日	平成10年5月15日 (1998. 5. 15)	(72) 発明者	ヘフレ, ゲルハルト
(86) 国際出願番号	P C T / E P 9 6 / 0 5 0 8 0		ドイツ連邦共和国 D-38124 ブラウン シュバイグ マッシエルオーデル ベッグ 1
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 1 9 0 8 6	(74) 代理人	弁理士 飯田 敏三
(87) 国際公開日	平成9年5月29日 (1997. 5. 29)		
(31) 優先権主張番号	1 9 5 4 2 9 8 6 . 9		
(32) 優先日	平成7年11月17日 (1995. 11. 17)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (D E)		
(31) 優先権主張番号	1 9 6 3 9 4 5 6 . 2		
(32) 優先日	平成8年9月25日 (1996. 9. 25)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (D E)		
最終頁に続く			

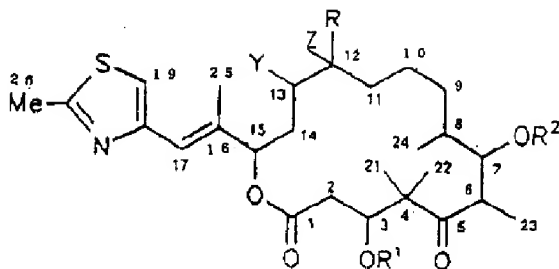
(54) 【発明の名称】 エポチロンCおよびD、製造法ならびに組成物

(57) 【要約】

本発明はエポチロン誘導体およびそれらの用途に関するものである。

【特許請求の範囲】

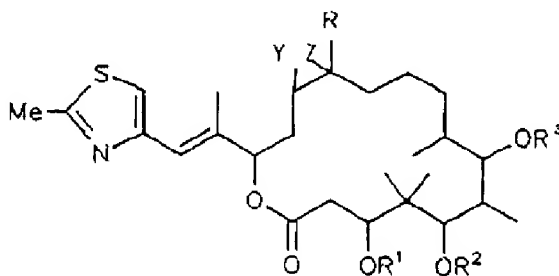
1. 式1であらわされるエボチロン誘導体。



1

(式中、RはH、C₁₋₄アルキルであり；R¹、R²はH、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アシル、ベンゾイル、C₁₋₄トリアルキルシリル、ベンジル、フェニル、またはそれぞれC₁₋₆アルコキシ、C₆アルキル、ヒドロキシによってもしくはハロゲンによっても置換されたベンジルもしくはフェニルであり；かつ前記基に含まれるアルキルおよびアシル基は直鎖基または枝分かれ基であり、ならびにYおよびZは同一でも異なってもいてもよく、各々水素、ハロゲン、プソイドハロゲン、OH、O- (C₁₋₆) アシル、O- (C₁₋₆) アルキルもしくはO-ベンゾイルを表すか、または一緒になってエポキシ基のO原子もしくはC=C二重結合のC-C結合の1つを形成し、エボチロンAおよびBを除く。)

2. 式2であらわされるエボチロン誘導体。

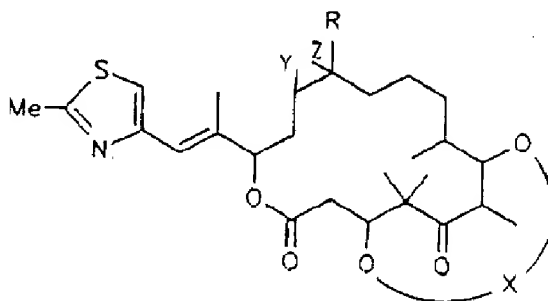


2

(式中、RはH、C₁₋₄アルキルであり；R¹、R²、R³はH、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アシル、ベンゾイル、C₁₋₄トリアルキルシリル、ベンジル、フェニル、ま

たはそれぞれC₁₋₆アルコキシ、C₆アルキル、ヒドロキシによってもしくはハロゲンによって置換されたベンジルもしくはフェニルであり；前記基に含まれるアルキルおよびアシル基は直鎖または枝分かれ基であり；ならびにYおよびZは請求項1で定義されたのと同義である。）

3. 式3であらわされるエボチロン誘導体。

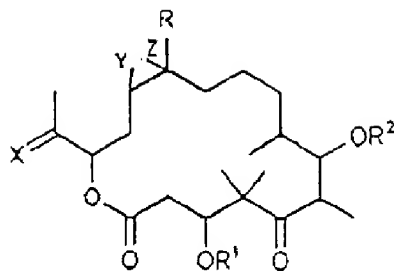


3

（式中、RはH、C₁₋₄アルキルであり；R¹、R²はH、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アシル、ベンゾイル、C₁₋₄トリアルキルシリル、ベンジル、フェニル、またはそれぞれC₁₋₆アルコキシ、C₆ア

ルキル、ヒドロキシによってもしくはハロゲンによって置換されたベンジルもしくはフェニルであり；前記基に含まれるアルキルおよびアシル基は直鎖または枝分かれ基であり、ならびにXは一般に—C(O)—、—C(S)—、—S(O)—、CR¹R²—または—SiR₂—をあらわし、ここでR、R¹およびR²は前記定義と同義であり、またR¹およびR²は一緒になって炭素原子2～6個を有するアルキレン基を形成してもよく；ならびにYおよびZは請求項1で定義されたのと同義である。）

4. 式4であらわされるエボチロン誘導体。

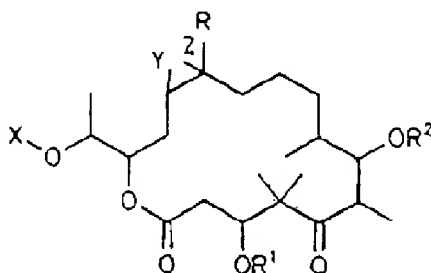


4

(式中、RはH、C₁₋₄アルキルであり；R¹、R²、R³、R⁴、R⁵はH、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アシル、ベンゾイル、C₁₋₄トリアルキルシリル、ベンジル、フェニル、またはそれぞれC₁₋₆アルコキシ、C₆アルキル、ヒドロキシによってもしくはハロゲンによって置換されたベンジルもしくはフェニルであり；前記基に含まれるアルキルおよびアシル基は直鎖基または枝分かれ基であり、Xは酸素、NOR³、N-NR⁴R⁵またはN-NHCONR⁴R⁵をあらわし、ここで基R³～R⁵は前記定義と同義であり、またR⁴およびR⁵は一緒になって炭素原子2～6個を有するアルキレ

ン基を形成してもよく；ならびにYおよびZは請求項1で定義されたのと同義である。)

5. 式5であらわされるエボチロン誘導体。

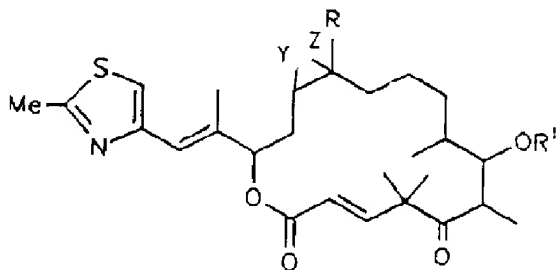


5

(式中、RはH、C₁₋₄アルキルであり；R¹、R²はH、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アシル、ベンゾイル、C₁₋₄トリアルキルシリル、ベンジル、フェニル、またはそれぞれC₁₋₆アルコキシ、C₆アルキル、ヒドロキシによってもしくはハロゲン

によって置換されたベンジルもしくはフェニルであり；前記基に含まれるアルキルおよびアシル基は直鎖基または枝分かれ基であり、ならびにXは水素、C₁₋₁₈アルキル、C₁₋₁₈アシル、ベンジル、ベンゾイルまたはシンナモイルをあらわし、ならびにYおよびZは請求項1で定義されたのと同義である。)

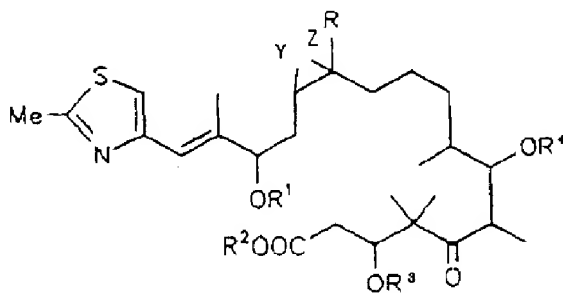
6. 式6であらわされるエボチロン誘導体。



6

(式中、RはH、C₁₋₄アルキルであり、R¹はH、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アシル、ベンゾイル、C₁₋₄トリアルキルシリル、ベンジル、フェニル、またはそれぞれC₁₋₆アルコキシ、C₆アルキル、ヒドロキシによってもしくはハロゲンによって置換されたベンジルもしくはフェニルであり；前記基に含まれるアルキルおよびアシル基は直鎖基または枝分かれ基であり；ならびにYおよびZは請求項1で定義されたのと同義である。)

7. 式7であらわされるエボチロン誘導体。



7

(式中、RはH、C₁₋₄アルキルであり、R¹、R²、R³、R⁴はH、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アシル、ベンゾイル、C₁₋₄トリアルキルシリル、ベンジル、フェニル

、またはそれぞれC₁₋₆アルコ

キシ、C₆アルキル、ヒドロキシによってもしくはハロゲンによって置換されたベンジルもしくはフェニルであり；前記基に含まれるアルキルおよびアシル基は直鎖基または枝分かれ基であり；ならびにYおよびZは請求項1で定義されたのと同義である。）

8．エポチロンA、エポチロンB、それらの3-OH-保護誘導体またはそれらの7-OH-保護誘導体を

(a) 酵素的に、特にエステラーゼまたはリパーゼで加水分解するか、または

(b) アルカリ性媒質中で、特にメタノール／水混合物中で水酸化ナトリウムで加水分解し、そして

式7のエポチロン誘導体を生成し、分離することを特徴とする請求項7記載の式7のエポチロン誘導体の製造方法。

9．請求項7記載の式7であらわされるエポチロン誘導体または請求項8記載の製造方法による生成物の形でのエポチロン誘導体を、

(a) ヤマグチ法によって、または

(b) コリー法によって、または

(c) ケログ法によって

変換して式1のエポチロン誘導体を生成させ、そしてその変換生成物を分離することを特徴とする請求項1記載の式1のエポチロン誘導体の製造方法。

10．エポチロンCを、特にジメチルジオキシランでまたは過酸でエポキシ化することを特徴とするエポチロンAおよび／または12，13-ビスエピ-エポチロンAの製造方法。

11．エポチロンDを、特にジメチルジオキシランでまたは過酸でエポキシ化することを特徴とするエポチロンBおよび／または12

，13-ビスエピ-エポチロンBの製造方法。

12．前記請求項のいずれか一項記載の化合物の1つ以上からなるか、またはこれらの化合物の1つ以上と通常の担体および／または希釈剤の1種以上との組み

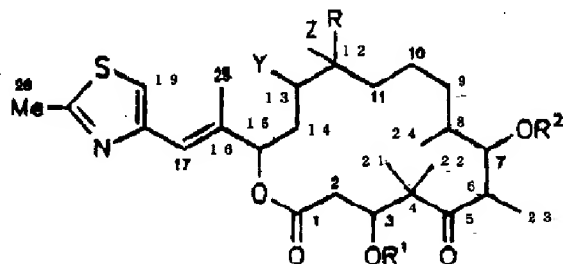
合わせからなる農林業および／または園芸における植物保護用組成物。

13. 請求項1～7の1つ以上に記載の化合物の1つ以上からなるか、または請求項1～7の1つ以上に記載の化合物の1つ以上と通常の担体および／または希釈剤の1種類以上との組み合わせからなる、特に細胞増殖抑制剤として使用するための治療学的組成物。

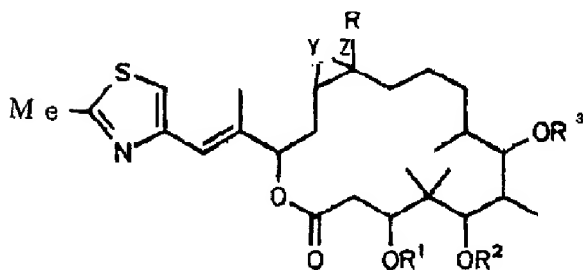
【発明の詳細な説明】

エボチロンCおよびD、製造法ならびに組成物

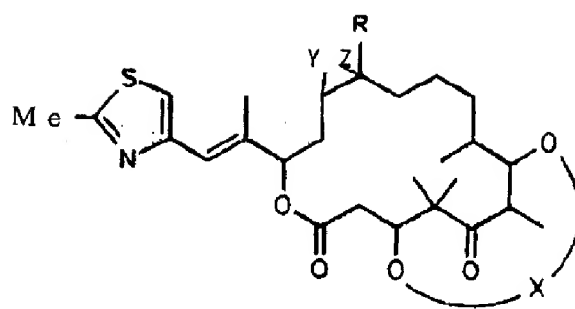
本発明は、一般的にはエボチロン誘導体および医薬の製造におけるそれらの用途に関するものである。本発明は特に、以下に示す一般式1～7のエボチロン誘導体の製造法、ならびに治療学的組成物および植物保護用組成物の製造におけるそれらの用途に関する。



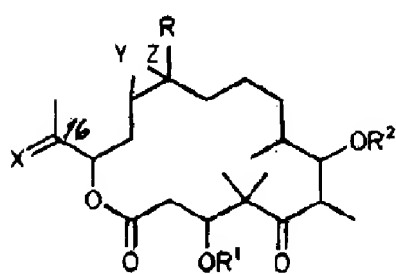
1



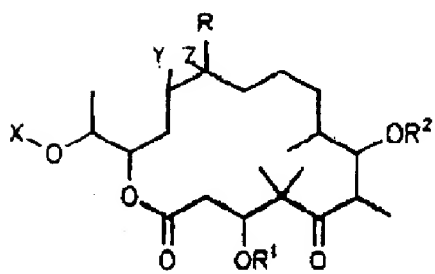
2



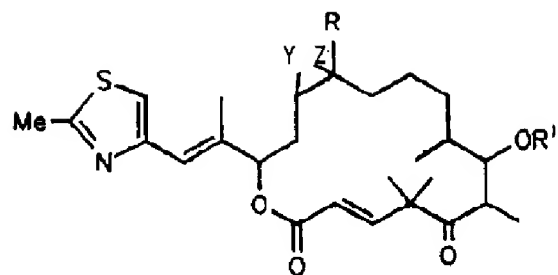
3



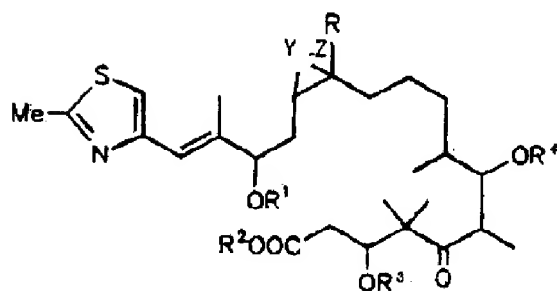
4



5



6



7

前記式 1 ～ 7 において、
 R は H、C₁₋₄ アルキルであり、
 R¹、R²、R³、R⁴、R⁵ は H、C₁₋₆ アルキル、
 C₁₋₆ アシルーベンゾイル、
 C₁₋₄ トリアルキルシリル、
 ベンジル、
 フェニル、
 それぞれ C₁₋₆ アルコキシ、C₆ アルキ
 ル、ヒドロキシルによってもしくはハロ
 ゲンによって置換されたベンジルもしく
 はフェニルであり、

基 R¹ ～ R⁵ の 2 つが一緒になって基 - (CH₂)_n - を形成することもでき、ここ
 で n は 1 ～ 6 であり、またそれらの基に含まれるアルキルおよびアシル基は直鎖

基または枝分かれ基であり、YおよびZは同じであっても異なってもよく、各々水素、例えばF、Cl、Br、またはIなどのハロゲン、例えば-NC(O)、-NC(S)または-N₃などのプソイドハロゲン、OH、O-(C₁₋₆) アシル、O-(C₁₋₆) アルキル、O-ベンゾイルを表わす。エポチロンAおよびBには特許を請求するものではないが、YおよびZはエポキシ基のO原子であってもよく、またはC=C二重結合を形成するC-C結合の1つであってもよい。

式3において、Xは一般的には-C(O)-、-C(S)-、-S(O)-、-C(R¹R²)- (R¹およびR²は前記定義と同義である。)、または-SiR₂- (Rは前記定義と同義である。)を表わす。

式4において、Xは酸素、NOR³、N-NR⁴R⁵またはN-NHCONR⁴R⁵をあらわし、ここで基R³~R⁵は前記定義と同義である。

式5において、Xは水素、C₁₋₁₈アルキル、C₁₋₁₈アシル、ベンジル、ベンゾイルまたはシンナモイルを表わす。

エポチロンAおよびBについてはDE-A-4 138 042を参照されたい。

一般式1にかかる化合物は、エポチロンAおよびBから、ならびにそれらの3-O-および/または7-O-保護誘導体から出発して、12, 13-エポキシ基を開裂することによって得ることができる。もしもその目的で好ましくは非水性溶媒中でハロゲン化水素

酸(hydrohalic acids)を用いる場合、ハロヒドリンX=H a l、Y=OHおよびY=OH、Y=H a lが得られる。例えばトルエンスルホン酸およびトリフルオロ酢酸などのプロトン酸は、水の存在下で12, 13-ジオール類を生じ、それらはその後、標準的方法によりアシル化(例えばカルボン酸無水物およびピリジンまたはトリエチルアミン/DMAPにより)、またはアルキル化(アルキルハライドおよび酸化銀)される。その目的で、3-および7-ヒドロキシル基はホルメート(NH₃/Me OHで除去)またはp-メトキシベンジルエーテル(DQで除去)の形で一時的に保護されてもよい。

一般式2にかかる化合物は、エポチロンAおよびBから、ならびにそれらの3-O-および/または7-O-保護誘導体からも、例えばメタノール中でN a B

H₄による還元によって得ることができる。もしも3-OHおよび/または7-OHが可逆的に保護される場合は、アシル化またはアルキル化し、それらの保護基を除去した後に、一般式2の5-O-置換誘導体または3, 5-もしくは5, 7-O-二置換誘導体を得ることができる。

エポチロンAおよびBと二官能性求電子試薬、例えば(チオ)ホスゲン、(チオ)カルボニルジイミダゾール、塩化チオニルまたは二塩化ジアルキルシリルまたはビストリフレートとの反応は、一般式3の化合物を与える。ピリジン、トリアルキルアミン類は任意にDMAPまたは2, 6-ルチジンとともに非プロトン性溶媒中で、そのプロセスにおける補助塩基として作用する。一般式3の3, 7-アセタール類は、例えばジメチルアセタールの酸触媒存在下でのアセタール交換反応によって生成される。

一般式4にかかる化合物はエポチロンAおよびBから、またはそれらの3-O-および/または7-O-保護誘導体から、オゾン分解および例えばジメチルスルフィドによる還元処理によって得られる。そのC-16-ケトン類はその後、当該技術分野の当業者に公知の標準的方法によってオキシム類、ヒドラゾン類またはセミカルバゾン類に変換することができる。それらはさらにウィッチヒ(Wittig)、ウィッチヒーホーナー(Horner)、ジュリア(Julia)またはペタセン(Petersen)によるオレフィン化法によってC-16-/C-17-オレフィン類に変換される。

一般式5にかかる16-ヒドロキシ誘導体はC-16-ケト基を例えば水素化アルミニウムまたは水素化ホウ素アルミニウムなどで還元することによって得ることができる。もしも3-OHおよび7-OHに適当な保護基が準備されれば、16-ヒドロキシ誘導体をアシル化またはアルキル化することができる。3-OHおよび7-OH基は、例えば、O-ホルミルの場合はNH₃/MeOHによって、またO-p-メトキシベンジルの場合はDDQによって遊離する。

一般式6の化合物は、7-OH基がアシル基またはエーテル基で保護されているエポチロンAおよびBの誘導体から、3-OH基を例えばホルミル化、メシル化またはトシル化し、その後それを塩基処理、例えばDBU処理によって除去す

ることによって得られる。7-OH基は上記のようにして遊離させることができる。

一般式7の化合物は、エポチロンAおよびBから、またはそれらの3-OH-および7-OH-保護誘導体から、例えばMeOH中またはMeOH/水中におけるNaOHによる塩基性加水分解によ

って得られる。好適には一般式7の化合物は、エポチロンAまたはBから、またはそれらの3-OH-または7-OH-保護誘導体から、酵素加水分解、特にエステラーゼまたはリパーゼによる加水分解によって得られる。そのカルボキシ基は、19-OH基をアルキル化によって保護した後、ジアゾアルカンでエステルに変換できる。

その上、式7の化合物は、ヤマグチ（塩化トリクロロベンゾイル/DMAP）、コリー（アルドリチオール/トリフェニルホスフィン）またはケログ（オメガ-臭素酸/炭酸セシウム）の方法によるラクトン化によって式1の化合物に変換することができる。有効な処理法は、イナナガらのBull. Chem. Soc. Japan、52巻（1979）1989ページ；コリーおよびニコラウのJ. Am. Chem. Soc.、96巻（1974）5614ページ；およびクルージンガおよびケログのJ. Am. Chem. Soc. 103巻（1981）5183ページに見い出すことができる。

本発明にかかる化合物を調製するために、エポチロンCまたはDから出発してもよく、その場合、誘導体化のためには前述の誘導体化法を参照されたい。12, 13-二重結合は、例えば触媒的にまたはジイミンによって選択的に水素化してもよく、または例えばジメチルジオキシランまたは過酸によってエポキシド化してもよく、またはジハライド、ジブソイドハライドまたはジアジドに変換してもよい。

本発明は、前記のエポチロン誘導体の1つ以上からなる、または前記エポチロン誘導体の1つ以上と通常の担体（1つまたは複数）および/または希釈剤（1つまたは複数）との組み合わせからなる

、農業、林業および/または園芸学における植物保護のための組成物にも関する

。

最後に、本発明は、前記化合物の1つ以上からなる、または前記化合物の1つ以上と、通常の担体（1つまたは複数）および／または希釈剤（1つまたは複数）との組み合わせからなる治療学的組成物に関する。これらの組成物は、特に細胞毒活性をあらわし、および／または免疫抑制を生じ、および／または悪性腫瘍を克服するために用いることができ、細胞増殖抑制剤(cytostatic agents)として特に好ましい。

本発明を、以下、多数の選択された実施態様の記述によってより詳細に示し、説明する。

例

例1

化合物1a

エポチロンA 20 mg (0.041 mmol) をアセトン 1 ml に溶解し、トリフルオロ酢酸 50 μ l (0.649 mmol) を加え、反応混合物を 50℃で一晩撹拌する。反応混合物に 1 M リン酸塩緩衝液 pH 7 を加えて反応を仕上げ、水相を酢酸エチルで 4 回抽出する。合わせて一つにした有機相を飽和塩化ナトリウム溶液で洗い、硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を除去する。粗生成物を分取層クロマトグラフィーによって精製する（溶出液：ジクロロメタン／アセトン、85 : 15）。

収量：異性体 I 4 mg (19%)

異性体 II 4 mg (19%)

異性体 I

Rf (ジクロロメタン／アセトン、85 : 15) : 0.46

IR (フィルム) : ν = 3440 (m, b, s h)、2946 (s, s h)、1734 (v s)、1686 (m)、1456 (m)、1375 (w)、1256 (s, s h)、1190 (w, b, s h)、1071 (m, s h)、884 (w)、735 (w) cm^{-1} 。

MS (20/70 eV) : m/e (%) = 493 (43 [M-H₂O]⁺)、39

4 (47)、306 (32)、206 (30)、181 (40)、166 (72)、139 (100)、113 (19)、71 (19)、57 (24)、43 (24)

微量分析: $C_{26}H_{39}O_6NS$ 理論値: $[M-H_2O]^+$ として

493.2498

分析値: 493.2478

異性体II

Rf (ジクロロメタン/アセトン、85:15): 0.22

IR (フィルム): $\nu = 3484$ (s, b, sh)、 2942 (vs, sh)、 1727 (vs)、 1570 (w)、 1456 (m)、 1380 (m)、 1265 (s)、 1190 (w)、 1069 (m)、 975 (w) cm^{-1} 。

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 $[M-H_2O]^+$)、394 (12)、306 (46)、206 (37)、181 (63)、166 (99)、139 (100)、113 (21)、71 (23)、57 (33)、43 (28)。

微量分析: $C_{26}H_{39}O_6NS$ 理論値: $[M-H_2O]^+$ として

493.2498

分析値: 493.2475

例2

化合物1b

エポチロンA 55 mg (0.111 mmol) をテトラヒドロフラン 0.5 ml に溶解し、1 N 塩酸 0.5 ml を加え、反応混合物を室温で 30 分間攪拌する。それから 1 N リン酸塩緩衝液 pH 7 を加え、水相を酢酸エチルで 4 回抽出する。合わせて一つにした有機相を飽和塩化ナトリウム溶液で洗い、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、溶媒を除去する。粗生成物を分取層クロマトグラフィーによって精製する (溶出液: ジクロロメタン/メタノール、90:10)。

収量: 19 mg (32%)。

ン、90/10)。収量：5mg (18%)。

Rf (ジクロロメタン/アセトン、90:10) : 0.67

IR (フィルム) : ν = 3497 (w, b, s h)、2940 (s, b, s h)、1725 (v s)、1468 (m, b, s h)、1379 (m)、1265 (s)、1253 (s)、1175 (v s)、972 (m, b, s h)、737 (s) cm^{-1} 。

MS (20/70 eV) : m/e (%) = 613 (9 $[\text{M}^+]$)、567 (43)、472 (63)、382 (23)、352 (21)、164 (100)、151 (33)、96 (31)、69 (17)、44 (26)。

微量分析 : $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_9\text{NSCl}$ 理論値 : $[\text{M}^+]$ として

613.2112

分析値 : 613.2131

例4

化合物1d

エポチロンB 10mg (0.020mmol) をテトラヒドロフラン0.5ml に溶解し、1N塩酸0.5ml を加え、反応混合物を室温で30分間攪拌する。それから1Mリン酸塩緩衝液pH7を加え、水相を酢酸エチルで4回抽出する。合わせて一つにした有機相を飽和塩化ナトリウム溶液で洗い、硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を除去する。粗生成物を分取層クロマトグラフィーで精製する(溶出液：ジクロロメタン/アセトン、85:15)。

収量：1mg (9%)

Rf (ジクロロメタン/アセトン、85:15) : 0.38

MS (20/70 eV) : m/e (%) = 543 (3 $[\text{M}^+]$)、507 (14)、320 (19)、234 (9)、194 (17)、182 (23)、164 (100)、140 (22)、113 (14)、71 (13)。

微量分析 : $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{NSCl}$ 理論値 : $[\text{M}^+]$ として

543.2421

分析値 : 543.2405

例5

化合物2a

エポチロンA100mg (0.203mmol)を、テトラヒドロフラン/1Mリン酸塩緩衝液pH7 (1:1) 4mlに溶解し、水素化ホウ素ナトリウム (150mg=3.965mmol)を、出発原料が完全に反応したことが薄層クロマトグラフィーによって示されるまで加える。その後1Mリン酸塩緩衝液pH7で希釈し、

水相を酢酸エチルで4回抽出する。合わせて一つにした有機相を飽和塩化ナトリウム溶液で洗い、硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を除去する。粗生成物をシリカクロマトグラフィーで精製する(溶出液:ジクロロメタン/アセトン、95:5、からジクロロメタン/アセトン、85:15、までの勾配)。

収量: (20%)

Rf (ジクロロメタン/アセトン、75:25): 0.27

IR (フィルム): ν = 3413 (s, b, sh)、2965 (vs, sh)、1734 (vs)、1458 (m, b, sh)、1383 (m, sh)、1264 (s, b, sh)、1184 (m, b, sh)、1059 (s, sh)、966 (s)、885 (w)、737 (m) cm^{-1} 。

MS (20/70eV): m/e (%) = 495 (6 $[\text{M}^+]$)、477 (8)、452 (12)、394 (9)、364 (16)、306 (49)、194 (19)、178 (35)、164 (100)、140 (40)、83 (21)、55 (27)。

微量分析: $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{NS}$ 理論値: $[\text{M}^+]$ として

495.2655

分析値: 495.2623

例6

化合物3a~d (a~dは立体異性体である)

エポチロン100mg (0.203mmol)をピリジン3mlに溶解し、塩化チオニル50 μ l (0.686mmol)を加え、反応混合物を室温で15分

間攪拌する。1 Mリン酸塩緩衝液 pH 7

をその後加えて、水相を酢酸エチルで4回抽出する。合わせて一つにした有機相を飽和塩化ナトリウム溶液で洗い、硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を除去する。粗生成物を精製し、4種類の立体異性体3 a～dを分取層クロマトグラフィーによって分離する（溶出液：トルエン／メタノール、90：10）。

化合物3 a

収量：4 mg（12%）

Rf（トルエン／メタノール、90：10）：0.50

IR（フィルム）： ν = 2961（m, b, sh）、1742（vs）、1701（vs）、1465（m, sh）、1389（m, sh）、1238（s, sh）、1210（vs, sh）、1011（s, sh）、957（s, b, sh）、808（m, sh）、768（s, sh） cm^{-1} 。

UV（メタノール）： λ_{max} （1 g イブシロン）= 210（4.50）、248（4.35）nm。

MS（20/70 eV）： m/e （%）= 539（40 $[\text{M}^+]$ ）、457（22）、362（16）、316（27）、222（30）、178（30）、164（100）、151（43）、96（38）、69（29）、55（28）、43（20）。

微量分析： $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{NS}_2$ 理論値： $[\text{M}^+]$ として539.2011

化合物3 b

収量：14 mg（13%）

Rf（トルエン／メタノール、90：10）：0.44

IR（フィルム）： ν = 2963（s, br, sh）、1740（vs）、1703（s）、1510（w）、1464（m, br, sh）、1389（m, sh）、1240（s, br, sh）、1142（m）、1076（w）、1037（w）、1003（m）、945（s, br, sh）、806（m, sh）、775（s）、737（m） cm^{-1} 。

UV (メタノール) ; ラムダ_{max} (1 g イプシロン) = 211 (4.16) 、 250 (4.08) nm。

MS (20/70 eV) : m/e (%) = 539 (27 [M⁺]) 、 475 (17) 、 322 (41) 、 306 (67) 、 222 (16) 、 206 (17) 、 194 (19) 、 178 (32) 、 164 (100) 、 151 (33) 、 125 (18) 、 113 (15) 、 96 (39) 、 81 (23) 、 64 (58) 、 57 (42) 、 41 (19) 。

微量分析 : C₂₆H₃₇O₇NS₂ 理論値 : [M⁺] として
539.2011
分析値 : 539.1998

化合物 3 c

収量 : 4 mg (4%)

Rf (トルエン/メタノール、90:10) : 0.38

MS (20/70 eV) : m/e (%) = 539 (51 [M⁺]) 、 322 (22) 、 306 (53) 、 222 (36) 、 178 (31) 、 164 (100) 、 151 (41) 、 96 (25) 、 81 (

20) 、 69 (26) 、 55 (25) 、 41 (25) 。

微量分析 : C₂₆H₃₇O₇NS₂ 理論値 : [M⁺] として
539.2011
分析値 : 539.2001

化合物 3 d

収量 : 1 mg (1%)

Rf (トルエン/メタノール、90:10) : 0.33

MS (20/70 eV) : m/e (%) = 539 (69 [M⁺]) 、 322 (35) 、 306 (51) 、 222 (41) 、 178 (31) 、 164 (100) 、 151 (46) 、 96 (31) 、 81 (26) 、 69 (34) 、 55 (33) 、 41 (35) 。

微量分析 : C₂₆H₃₇O₇NS₂ 理論値 : [M⁺] として

539.2011

分析値: 539.1997

例7

化合物4a

エポチロンA 10 mg (0.020 mmol) をジクロロメタン 2 ml に溶解し、 -70°C にまで冷却し、それから5分間、微かに青く色がつくまでオゾンで処理する。続いて、生成した反応混合物にジメチルスルフィド 0.5 ml を加え、それを室温まで加熱する。反応混合物の溶媒を除去して反応を仕上げ、最後に分取層クロマトグラフィーを行う (溶出液: ジクロロメタン/アセトン/メタノール、85:10:5)。

収量: 5 mg (64%)

Rf (ジクロロメタン/アセトン/メタノール、85:10:5): 0.61

IR (フィルム): ν_{max} = 3468 (s, br, sh)、2947 (s, br, sh)、1734 (vs, sh)、1458 (w)、1380 (w)、1267 (w)、1157 (w)、1080 (w)、982 (w) cm^{-1} 。

UV (メタノール): λ_{max} (1 g/l エプシロン) = 202 (3.53) nm

。

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 $[\text{M}^+]$)、380 (4)、267 (14)、249 (17)、211 (20)、193 (26)、171 (34)、139 (34)、111 (40)、96 (100)、71 (48)、43 (50)。

微量分析: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_7$ 理論値: $[\text{M}^+]$ として

398.2305

分析値: 398.2295

例8

化合物6a

3, 7-ジ- α -ホルミル-エポチロンA 10 mg (0.018 mmol) をジクロロメタン 1 ml に溶解し、1, 8-ジアザビシクロ [5.4.0] ウンデ

カー 7-エン (DBU) $27\mu\text{l}$ (0.180mmol) を加え、反応混合物を室温で 60 分間攪拌する。反応混合物に 1M リン酸塩二水素ナトリウム緩衝液 pH 4.5 を加えて仕上げ、その水相を酢酸エチルで 4 回抽出する。合わせて一つ

にした有機相を飽和塩化ナトリウム溶液で洗い、硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を除去する。溶媒を除去した後、生成した粗生成物をメタノール 1ml に溶解し、アンモニア性メタノール溶液 $200\mu\text{l}$ ($2\text{mmol NH}_3/\text{ml}$ メタノール) を加え、その混合物を室温で一晩攪拌する。溶媒を真空下で除去して分離する。

収量: 4mg (22%)

Rf (ジクロロメタン/アセトン, 85:15): 0.46

IR (フィルム): $\nu_{\text{max}} = 3445$ (w, br, sh), 2950 (vs, br, sh), 1717 (vs, sh), 1644 (w), 1466 (m, sh), 1370 (m, sh), 1267 (s, br, sh), 1179 (s, sh), 984 (s, sh), 860 (w), 733 (m) cm^{-1} 。

UV (メタノール): λ_{max} (1 g イプシロン) = 210 (4.16) nm

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 $[\text{M}^+]$), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26)。

微量分析: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{NS}$ 理論値: $[\text{M}^+]$ として

475.2392

分析値: 475.2384

例 9

化合物 6b

3, 7-ジ-*O*-ホルミル-エポチロン A 50mg (0.091

mmol) をジクロロメタン 1ml に溶解し、1, 8-ジアザビシクロ [5.4.0] ウンデカ-7-エン (DBU) 2ml (0.013mmol) を加え、反

応混合物を90℃で12時間攪拌する。反応混合物に1Mリン酸塩二水素ナトリウム緩衝液pH4.5を加えて仕上げ、その水相を酢酸エチルで4回抽出する。合わせて一つにした有機相を飽和塩化ナトリウム溶液で洗い、硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を除去する。2種類の化合物からなる粗生成物を分取層クロマトグラフィーによって精製する（溶出液：ジクロロメタン／アセトン、90：10）。

収量：7mg（15%）

物質コード

Rf（ジクロロメタン／アセトン、90：10）：0.62

IR（フィルム）： ν = 2951（m, br, sh）、1723（vs）、1644（w, br, sh）、1468（w）、1377（w）、1271（m, br, sh）、1179（s）、987（m, br, sh）、735（w, br, sh） cm^{-1} 。

UV（メタノール）： λ_{max} （1gイブシロン）= 210（4.44）nm。

MS（20/70eV）： m/e （%）= 503（68 $[\text{M}^+]$ ）、408（58）、390（32）、334（25）、316（34）、220（21）、206（27）、194（20）、181（33）、164（100）、151（34）、139（28）、113（20）、96（82）、81（33）、67（24）、55（26）、43（22）。

微量分析： $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{O}_6\text{NS}$ 理論値： $[\text{M}^+]$ として

503.2342

分析値：503.2303

例10

化合物6c

3,7-ジ-*O*-アセチル-エポチロン5mg（0.009mmol）をメタノール1mlに溶解し、アンモニア性メタノール溶液（2mmol NH_3 /mlメタノール）150 μ lを加え、反応混合物を50℃で一晩攪拌する。

分離のために溶媒を真空下で除去する。粗生成物を分取層クロマトグラフィーによって精製する（溶出液：トルエン／メタノール、90：10）。

収量：3 mg（67%）

Rf（ジクロロメタン／アセトン、90：10）：0.55

IR（フィルム）： ν = 2934（s, br, sh）、1719（vs, b, sh）、1641（m）、1460（m, sh）、1372（s, sh）、1237（vs, b, sh）、1179（s, sh）、1020（s）、963（s, sh）、737（vs） cm^{-1} 。

UV（メタノール）： λ_{max} （1 g イプシロン）= 210（4.33）nm。

MS（20/70 eV）：m/e（%）= 517（57 [M⁺]）、422（58）、318（31）、194（20）、181（34）、166（100）、151（31）、96（96）、81（32）、69（27）、55（29）、43（69）。

微量分析：C₂₈H₃₉O₆NS 理論値：[M⁺]として

517.2498

分析値：517.2492

例 11

化合物 7 a

エポチロン 20 mg（0.041 mmol）をメタノール 0.5 ml に溶解し、1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.5 ml を加え、反応混合物を室温で 5 分間攪拌する。

反応混合物に 1 M リン酸塩緩衝液 pH 7 を加えて仕上げ、その水相を酢酸エチルで 4 回抽出する。合わせて一つにした有機相を飽和塩化ナトリウム溶液で洗い、硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を除去する。粗生成物を分取層クロマトグラフィーで精製する（溶出液：ジクロロメタン／メタノール、85：15）。

収量：11 mg（52%）

Rf（ジクロロメタン／メタノール、85：15）：0.92

IR (フィルム) : $\nu = 3438$ (s, br, sh)、 2971 (vs, br, sh)、 1703 (vs)、 1507 (m)、 1460 (s, sh)、 1383 (m, sh)、 1254 (w)、 1190 (w, br, sh)、 1011 (w, br, sh)、 866 (w, br)、 729 (s) cm^{-1} 。

MS (20/70 eV) : m/e (%) = 423 (0.1 [M^+])、 323 (4)、 168 (89)、 140 (100)、 85 (31)、 57 (67)。

微量分析 : $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{NS}$ 理論値 : [M^+] として

423.2443

分析値 : 423.2410

例12

化合物7b

7-*O*-アセチル-エポチロン5mg (0.009mmol) をメタノール1ml に溶解し、アンモニア性メタノール溶液 (2mmol NH_3 /ml メタノール) $200\mu\text{l}$ を加え、反応混合物を 50°C で2日間攪拌する。分離のためにその溶媒を真空下で除去する。粗生成物を分取層クロマトグラフィーによって精製する (溶出液 : トルエン/メタノール、90 : 10)。

収量 : 3mg (59%)

Rf (ジクロロメタン/メタノール、90 : 10) : 0.63

IR (フィルム) : $\nu = 3441$ (m, br, sh)、 2946 (s, sh)、 1732 (vs)、 1600 (w)、 1451 (m)、 1375 (m)、 1246 (s, b, sh)、 1013 (m, b, sh) cm^{-1} 。

UV (メタノール) : λ_{max} (1gイプシロン) = 211 (3.75)、 247 (3.59) nm。

MS (20/70 eV) : m/e (%) = 567 (1 [M^+])、 465 (4)、 422 (7)、 388 (5)、 194 (5)、 182 (7)、 168 (65)、 164 (17)、 140 (100)、 97 (10)、 71 (22)、 43 (27)。

微量分析 : $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_8\text{NS}$ 理論値 : [M^+] として

分析値：567.2849

例13

エポチロンA 50 mg をジメチルスルホキシド 20 μ l に溶解し、リン酸塩緩衝液 (pH 7.1, 30 mM) 30 ml で希釈する。ブタ肝エステラーゼ (ペーリンガー・マンハイム) 5 mg を添加後、混合物を 30℃ で 2 日間攪拌する。混合物を 2 N HCl で pH 5 まで酸性にし、エポチロン酸 7 を酢酸エチルで抽出する。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、真空下で蒸発乾固する。収量：48 mg (96%)。

例14

48 mg のエポチロン酸 7 を無水 THF 6 ml に溶解し、攪拌しながらトリエチルアミン 40 μ l および 2, 4, 6-トリクロロベンゾイルクロリド 16 μ l を加える。15 分後、沈殿をろ過して除去し、無水トルエン 200 ml 中の 4-ジメチルアミノピリジン 20 mg の沸騰溶液に、激しく攪拌しながらろ液を 15 分以内に滴下する。さらに 10 分後、その混合物を真空下で蒸発濃縮し、残渣を酢酸エチル/クエン酸塩緩衝液 (pH 4) 間に分配した。分取 HPLC による分離後、有機相の蒸発残渣はエポチロン A 15 mg を与える。

例15

出発原料としてのエポチロン C および D

A. エポチロンの基本特許に対応する産生菌株および培養条件。

B. DSM 6773 を用いる産生

培養物 75 リットルを基本特許に記載のように増殖させ、これを用いて、産生培地 700 リットルを含む産生発酵槽に接種する。産生培地は、0.8% 澱粉、0.2% グルコース、0.2% 大豆粉、0.2% 酵母抽出物、0.1% CaCl₂ × 2H₂O、0.1% MgSO₄ × 7H₂O、8 mg/リットルの Fe-EDTA、pH = 7.4 および任意に 15 リットルのアンバーライト XAD-16 吸着樹脂からなる。発酵は 30℃ で、1 時間に 2 m³ の空気を通気しながら 7~10 日

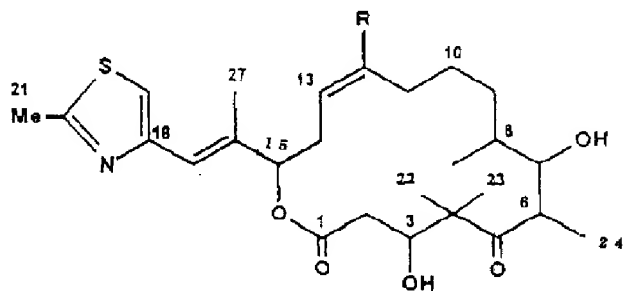
間行われる。p O₂は回転速度の調節によって30%に維持される。

C. 分離

吸着樹脂を、0.7 m²の100-メッシュプロセスフィルターを用いて培養物から分離し、3ベッド容量の水/メタノール2:1で洗って極性不純物を除去する。4ベッド容量のメタノールで溶出すると、粗抽出物が得られ、それを真空下で濃縮し、水相があらわれるまで蒸発させる。その後それを同容量の酢酸エチルで3回抽出する。有機相の蒸発による濃縮は生の抽出物240gを与える。それをメタノールとヘプタンの間に分配し、親油性不純物を分離除去する。メタノール相から真空蒸発によって180gの分離物が得られる。これはセファデックスLH-20(20×100cmカラム、20ml/minのメタノール)で3部分に分画化される。エポチロンが含まれる留分は240～300分の滞留時間で溶出され、その留分は総計72gを含む。エポチロン類を分離するために、リクロソルブ(Lichrosorb)RP-18の3部分でクロマトグラフィーを行う(15μm、10×40cmカラム、溶出液180ml

/minメタノール/水65:35)。エポチロンAおよびBの後に、Rf=90～95分でエポチロンCが、Rf=100～110分でエポチロンDが溶出し、それらは真空下で蒸発後、それぞれ無色の油状物として0.3gの収量で得られる。

D. 物理的特性



エポチロンC R=H

エポチロンD R=CH₃

エポチロンC

$C_{26}H_{39}NO_5S$ [477]

ESI-MS: (正イオン): $[M+H]^+$ として478.5

1H および ^{13}C 、NMR表を参照されたい。

TLC (薄層クロマトグラフィー): $R_f=0.82$

TLCアルミニウムホイル60F254メルク、溶出液: ジクロロメタン/メタノール=9:1

検出: 254nmにおけるUV吸光度。ワニリン/硫酸試薬を噴霧、120℃に加熱すると青灰色が発色。

HPLC: $R_f=11.5$ 分

カラム: ヌクレオシル100C-18 7 μ m、125 \times 4mm

溶離液: メタノール/水=65:35

流速: 1ml/分

検出: ダイオードアレイ

エボチロンD

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]

ESI-MS: (正イオン): $[M+H]^+$ として492.5

1H および ^{13}C 、NMR表を参照されたい。

TLC: $R_f=0.82$

TLCアルミニウムホイル60F254メルク、溶出液: ジクロロメタン/メタノール=9:1

検出: 254nmにおけるUV吸光度。バニリン/硫酸試薬を噴霧、120℃に加熱すると青灰色が発色。

HPLC: $R_f=15.3$ 分

カラム: ヌクレオシル100C-18 7 μ m、125 \times 4mm

溶出液: メタノール/水=65:35

流速: 1ml/分

検出: ダイオードアレイ

表：[D₆] DMSO中300MHzにおけるエポチロンCおよび
エポチロンDの¹Hおよび¹³C NMRデータ

エポチロンC				エポチロンD		
H原子	δ (ppm)	C原子	δ (ppm)	δ (ppm)	C原子	δ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H ₃	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5
22-H ₃	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-H ₃	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H ₃	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9
25-H ₃	0.90			0.91	27	14.1
26-H ₃				1.63		
27-H ₃	2.10			2.11		

*, ** 配置に互換性あり

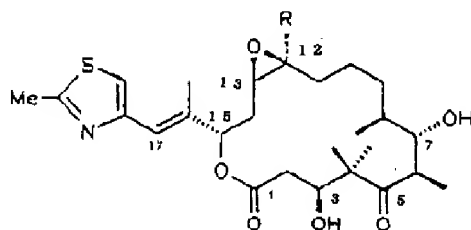
例16

エポチロンCからエポチロンAおよび12, 13-ビスエビーエポチロンA

エボチロンC 50 mg をアセトン 1.5 ml に溶解し、アセトン中のジメチルジオキシランの 0.07 M 溶液 1.5 ml を加える。室温で 6 時間静置後、真空下で蒸発して濃縮し、シリカゲル上の分取 HPLC によって分離する（溶出液：メチル tert-ブチルエーテル／石油エーテル／メタノール 33：66：1）。
収量：

エボチロンA 25 mg、Rf = 3.5 分（分析 HPLC、7 μ m、4 \times 250 mm カラム、溶出液は上記参照、流速 1.5 ml/分）および

12, 13-ビスエピーエボチロンA 20 mg、Rf = 3.7 分、ESI-MS（正イオン）、m/z = 494 [M+H]⁺、[D₄] メタノール中の ¹H-NMR、選択シグナル：デルタ = 4.32 (3-H)、3.79 (7-H)、3.06 (12-H)、3.16 (13-H)、5.54 (15-H)、6.69 (17-H)、1.20 (22-H)、1.45 (23-H)



12, 13-ビスエピーエボチロンA R=H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/05080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D493/04 C07D417/06 C07D277/24 A61K31/425 C07F7/08
 C07D493/08 A01N43/78 A01N43/90 //(C07D493/04,313:00,
 303:00),(C07D493/08,321:00,313:00)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH)) 27 May 1993 see claims -----	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 1997

Date of mailing of the international search report

13.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 1280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Henry, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/05080

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9310121	27-05-93	DE-A- 4138042	27-05-93
		AU-A- 2943792	15-06-93

Form PCT/ISA/210 (patent family search) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード' (参考)
A 6 1 K 31/427		A 6 1 K 31/425	6 0 2
C 0 7 D 313/00		C 0 7 D 313/00	
417/06	3 1 3	417/06	3 1 3
493/04	1 1 1	493/04	1 1 1
493/08		493/08	C
497/08		497/08	
C 0 7 F 7/18		C 0 7 F 7/18	S
			U

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), JP, US

(72) 発明者 キッフエ, ミヒャエル

ドイツ連邦共和国 D-38124 ブラウン
シュバイグ マッシエルオーデル ベッグ